

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平2-57179

⑤ Int. Cl.³ 識別記号 庁内整理番号 ⑬ 公開 平成2年(1990)2月26日
 C 12 N 9/00 7823-4B
 15/52 ZNA
 //(C 12 N 9/00
 C 12 R 1:91)
 8717-4B C 12 N 15/00 A
 審査請求 未請求 請求項の数 3 (全14頁)

⑭ 発明の名称 アセチル-CoAカルボキシラーゼ

⑯ 特 願 昭63-208170

⑰ 出 願 昭63(1988)8月24日

⑱ 発 明 者 田 邊 忠 大阪府豊中市東豊中町3丁目18-13

⑲ 出 願 人 明治乳業株式会社 東京都中央区京橋2丁目3番6号

明 細 書

1. 発明の名称

アセチル-CoAカルボキシラーゼ

2. 特許請求の範囲

1. 第2図に示すヌクレオチド配列とアミノ酸配列を有するチキンリバー(chicken liver)由来のアセチル-CoAカルボキシラーゼ。

2. 請求項1記載のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列の一部が、下記のヌクレオチド及びアミノ酸に置換されたヌクレオチド配列とアミノ酸配列を有するチキンリバー由来のアセチル-CoAカルボキシラーゼ。

31番目のCがT; 123番目のCがG又はT; 141番目のGがA; 188番目のCがG又はA; 187番目のCがA; 657番目のAがG; 663番目のTがG; 782番目のAがG; 965番目のGがA; 1584番目のAがG; 1700番目のCがA; 3093番目のTがC; 3177番目のCがG又はA; 4008番目のTがC; 4393番目のGがA; 4504番目のGがA; 4540 目のCがA; 4712番目のGがA; 4881番目のGがA; 4957番目のCがA; 5302 目のGがA

; 5367番目のCがA; 6040番目のGがA; 6447番目のGがA; 6561番目のGがA; 6706番目のGがA; 683番目のGlyがArg; 261番目のAsnがSer; 322番目のArgがLys; 567番目のArgがHis; 1467番目のGluがLys; 1502番目のAlaがThr; 1514番目のGlyがSer; 1571番目のGlyがGlu; 1653番目のAspがAsn; 1768番目のGlyがArg; 2014番目のGlyがArg; 2236番目のValがIle

3. 請求項1記載のヌクレオチド配列591-683番目及びアミノ酸配列の198-228番目が削除されたヌクレオチド配列とアミノ酸配列を有するチキンリバー由来のアセチル-CoAカルボキシラーゼ。

3. 発明の詳細な説明

本発明はアセチル-CoAのアセチル基にCO₂を結合させ、脂肪酸の生合成の重要な中間体であるマロニル-CoAを合成する反応を触媒する酵素であるアセチル-CoAカルボキシラーゼに関する。

アセチル-CoAカルボキシラーゼ[CO₂リガーゼ(ADP形成)、EC 6.4.1.2.]はビオチンを補酵素として共有結合している細胞質酵素で、ATPの存在下

アセチル-CoAの炭酸化を触媒しマロニル-CoA、即ち脂肪酸合成に必要な2個単位の炭素原子の活性化されたドナー(donor)を生成する。これまでに蓄積された証拠はアセチル-CoAカルボキシラーゼが長鎖脂肪酸の生合成の調節に決定的な役割を果たしていることを示している(文献1及び2)。アセチル-CoAカルボキシラーゼの細胞内含量は栄養、ホルモン、発生及び遺伝等の様々な条件の中での脂肪酸合成速度とともに変動する。動物の均一なアセチル-CoAカルボキシラーゼの標品は、これまでラット(文献3~5)及びチキンリバー(chicken liver; 文献6及び7)、ラット(文献8)、ウサギの乳腺(文献9)及びガチョウの尾脂腺(文献10)を含む様々な組織から得られている。

この酵素は高度のintegrated structureを示し、分子量220,000~260,000を有する一種類のサブユニットからなる(文献3~10)。この単一サブユニットは調節機能のみならずピオチンカルボキシルキャリアー蛋白質、ピオチンカルボキシラーゼ

及びカルボキシルトランスフェラーゼからなる三つの触媒機能を有している(文献4)。

この酵素の調節の土台となる分子メカニズムを理解するために、該酵素の触媒ドメイン及び調節ドメインの構造的な機構を解明することが重要である。

本発明者は最近、蛋白質化学及び分子クローニングの手法を用いてチキンリバーのアセチル-CoAカルボキシラーゼのピオチン結合部位近辺の一次構造を発表した(文献11)。本発明者は、ここにチキンリバーのアセチル-CoAカルボキシラーゼの全アミノ酸配列を提供するものである。この配列はcDNAのヌクレオチド配列から推定されたものである。これはピオチン依存性カルボキシラーゼに対して与えられた最初の完全なアミノ酸配列である。

本発明者は先にエッグレイニングヘンリバーから得たpoly(A)⁺RNA(文献11)を用いて岡山ーバーグ法(文献12)によりアセチル-CoAカルボ

キシラーゼに対する一つのcDNAクローンを分離した。このクローンpACC 33は該酵素のポリペプチド配列の限られた一部分のみをコードしていたので、本発明者はこの最初のcDNAクローンをプローブとして用い、該酵素の全蛋白をコードするヌクレオチド配列まで伸びるcDNAクローン群を得ることを試みた(第1図参照)。

pACC 33のcDNAの3'部分はクローンpACC 206の配列とオーバーラップする763bpの配列を含んでいるが、ヌクレオチド3321より下流のミスマッチ部分を有していた(第1図の説明参照)。

同様にpACC 206の3'末端部分(ヌクレオチド4596より下流)はpACC 249とpACC 256の配列と一致しなかった。

これらpACC 33及びpACC 206の前記ミスマッチ部分はイントロン配列であった。

pACC 33の蛋白をコードする配列の正確さを確認するために、本発明者はpACC 33の蛋白をコードする領域から得たcDNA断片[EcoRI(1480)~KpnI(2926)]によりオリゴ(dT)をプライマーとし

て作成したcDNAライブラリー(オリゴ(dT)ブラムドcDNAライブラリー)をスクリーニングした。このようにしてpACC 263、pACC 268、及びpACC 271を含む12個の陽性クローンを得た。得られた全てのクローンにはpACC 33の制限酵素地図との相違点が全く無かった。

5'末端領域のcDNAを保有するクローン群を単離するためにアセチル-CoAカルボキシラーゼをコードするmRNAに特異的なオリゴデオキシヌクレチドを用い、プライマー伸長によりcDNAライブラリーを作成した。これらのcDNAライブラリーをスクリーニングしてpACC 78、pACC 93、pACC 94、pACC157、pACC 196及びpACC 243を含むクローン群を得た(図1)。これらのクローンの内pACC 196は最も上流のcDNA配列を保有していた。クローンpACC 78のcDNAとクローンpACC 93、pACC 94及びpACC387とを比較すると、pACC 78には936bp(ヌクレオチド581-683に対応)の欠失が見られた。プライマー伸長反応によるcDNAライブラリーから単離されたクローン群の

中で分析された8クローンの内、pACC 93、pACC 94及び一つのクローン(第1図には示されていない)を含む3つのクローンは前記欠失部位が存在しなかった。オリゴ(dT)プライムド cDNA ライブラリーから得たクローン pACC 387 の cDNA にもこのような欠失は存在しなかった。cDNA 配列の読み取り枠を確認するために、本発明者はチキンリバーアセチル-CoAカルボキシラーゼの部分的なアミノ酸配列を分析した。精製した該酵素をスタフィロコッカプロティナーゼで限定分解後、分離用 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、ペプチド断片に分離した。単離した31kDa(文献11)のペプチドと41kDaのペプチドのアミノ酸配列を分析した(表1)。

又、精製した該酵素をアクロモバクタープロティナーゼ I で分解し、得られたペプチド断片を逆相 HPLC(文献11)で分離した。配列が決定されたペプチドを第2図及び表1に、ヌクレオチドと関連付けて示す。

分解されていない完全なまま(intact)での該酵

-7-

して選んだことが正当であることを証明する蛋白解析のデータはないが、真核生物においては第1番目のATGが開始コドンではないケースは稀である。

チキンリバーから得た全RNAをcDNA断片で調べたところ、大きさが約12,000ヌクレオチドであると推定される、ハイブリダイゼーション陽性のRNAが認められた。この大きさはクローン化したcDNA(7368ヌクレオチド)の長さを考慮すると、アセチル-CoAカルボキシラーゼをコードするmRNAの3'側の非翻訳領域がかなり長いことを示唆するものである。即ち第2図に示されている長さ242bpの3'非翻訳配列部分は、前記の3'非翻訳領域の上流の一部分に相当しているに過ぎない。

チキンリバーのアセチル-CoAカルボキシラーゼは、そのcDNA配列から計算上の分子量が262,706であり、開始メチオニンを含む2324個のアミノ酸残基からなることが予想される。チキンリバーのアセチル-CoAカルボキシラーゼの考え得るピオチンカルボキシルキャリアー蛋白質の一次構造が

案のポリペプチドのアミノ末端配列を、自動エドマン分解により決定する試みは成功しなかった。図2にチキンリバーアセチル-CoAカルボキシラーゼに対するcDNAの7368ヌクレオチド配列を示す。2324個のアミノ酸配列をコードするただ一つの読み取り枠(open reading frame)が存在する。このアミノ酸配列は、それぞれのペプチドをエドマン分解することによって決定されたアミノ酸配列と同一である。

本発明者は翻訳開始コドンとして最初のATG(ヌクレオチド1-3)を特定した。この推定上の開始コドンの周辺のヌクレオチド配列はKozak(文献21)に記載された真核生物の開始コドンに対するコンセンサスシーケンス(consensus sequence)とよく一致する。読み取り枠とは無関係である、cDNAの5'非翻訳領域には更にその上流のATGは全く見られなかった。前記コンセンサスシーケンス(文献21)と一致する2番目のメチオニン(アミノ酸残基の13番目)ではなく、1番目のメチオニン(アミノ酸残基の1番目)を翻訳開始コドンと

-8-

報告されている(文献11)。本研究において、その領域の存在箇所は、以前に提案されたピオチン結合部位(文献11)、即ち第2図に示すアミノ酸残基786番目のLysを含む箇所であることが解明された。

以下本発明を実施例に基づき説明する。

(実施例)

① cDNAライブラリーの作成とスクリーニング
エッグレイイグヘン リバー(egg-laying hen liver)から得たpoly(A)⁺RNAを用いて岡山-バーグ法(文献12)によりcDNAライブラリー(以下第一岡山-バーグcDNAライブラリーという)を作成した(文献11)。更に6日齢チキンリバーから得たpoly(A)⁺RNA 19.2μgとベクタープライマーDNA 4.2μgとにより上記と同様にcDNAライブラリー(以下第二岡山-バーグcDNAライブラリーという)を作成した。

又、10μgのオリゴ(dT)₁₂₋₁₈をプライマーとしてチキンリバーpoly(A)⁺RNA 10μgを鋳型にして

-9-

-10-

cDNAライブラリー（以下第三のcDNAライブラリーという）を作成した（文献13）。

上流部位のヌクレオチド配列を持つcDNA群をクローニングするため、自動DNA合成器により合成した三種類のオリゴデオキシヌクレオチド（後述する）をプライマーとして逆転写により上流部分のcDNA群を合成した。即ち、前記プライマー0.1~1nmolを用い、チキンリバーから得たpoly(A)⁺RNA 100~200μgを鋳型にして一本鎖cDNAを合成し、ついで二本鎖とし、S1エンドヌクレアーゼで処理し、その3'末端にpoly(dC)鎖を付加した。このcDNA断片をプラスミドpBR322の、poly(dC)鎖を付加したPst I部位に挿入した。これらの操作は本質的に文献14に記載された操作と同様であった。形質転換とスクリーニングは文献15に記載されたものと同様に行なった。

他に特に指定しない限りスクリーニングはcDNA断片をプローブとして用い、60℃でin situハイブリダイゼーションにより実施した。クローン選別のためのハイブリッド形成用プローブはこれ

らプローブの5'末端を、T4ポリヌクレオキナーゼと[γ-³²P] ATPとにより標識するか（文献16）、ニクトランスレーションにより標識するか（文献17）、又は[γ-³²P] dCTPによるランダムプライミング法（文献18）により標識した。

② cDNAクローン群の単離

cDNAクローン群の単離を第1図に基づき説明する。

クローンpACC 33の3'末端部分から得た1.6kbのKpn I断片を用いて第二岡山-バーグcDNAライブラリーからの形質転換体7×10⁵個をスクリーニングしてクローンpACC 206を得た。このpACC 206のcDNAフラグメント（ヌクレオチド4219-4596を含む）を用いて第三のcDNAライブラリーからの形質転換体4×10⁵個をスクリーニングしてクローンpACC 249及びpACC 258を含む7個の陽性クローンを得た。更にこのpACC 249のcDNAインサートを用いて前記第三のcDNAライブラリーからの形質転換体5×10⁵個をスクリーニングしてクローンpACC 367を含む約30個の陽性クロー

-11-

ンを得た。前記クローンpACC 249のHinf I (4772)-Hinf I (5261)cDNA断片を用いて第二岡山-バーグcDNAライブラリーからの形質転換体7×10⁵個をスクリーニングしてクローンpACC 329を得た。前記同じフィルターを、pACC 329のPvu II (5536)-Pvu II (6763)を用いてスクリーニングするために再使用した。その結果pACC 392を含む3個の陽性クローンを得た。クローンpACC 403はpACC 329のPvu II (5536)-Pvu II (6763)断片による第三のcDNAライブラリーからの形質転換体5×10⁵個をスクリーニングすることによって得られた。pACC 33のEcoRI (1480)-Kpn I (2926)断片を用いて第三のcDNAライブラリーからの形質転換体4×10⁵個をスクリーニングしてクローンpACC 263、pACC 268及びpACC 271を含む12個の陽性クローンを得た。

クローンpACC 387はpACC 33のcDNAインサートの5'側に位置するPst I部位からHind III (1229)へ延びる351bpの断面を用いて、第三のcDNAライブラリーからの形質転換体5×10⁵個から単離され

た。

pACC 33のヌクレオチド1124-1137に相補的な第一の合成オリゴヌクレオチド5'-GGAGCAATCCGAC-3'をプライマーとして、ヘンリバー(hen liver) poly(A)⁺RNAを鋳型にして逆転写により一本鎖cDNAを合成した。二本鎖cDNAとした後、pBR 322に導入し、クローン化した。得られたクローンを2回スクリーニングした（14×10⁵個の形質転換体を2回）。そのSau3A I (927)-Sau3A I (1083)断片はpACC 78を含む5個の陽性クローンを与えた。そしてこのpACC 78のヌクレオチド277-471を含むcDNAフラグメントはpACC 93とpACC 94を含む8個の陽性クローンを与えた。ヌクレオチド418-424に相補的な第二の合成オリゴヌクレオチド5'-AACATCTCATAGGACCA-3'をプライマーとして、8日齢チキンリバーpoly(A)⁺RNAを鋳型にしてcDNAを合成し、得られた5×10⁵個の形質転換体を、cDNAでスクリーニングして約390個の陽性クローンを得た。これらのクローンの中で分析された102個のクローンの内、pACC 157とpACC 198が

-12-

-13-

-14-

最も上流に伸長しているようであった。

第三の合成ヌクレオチド 5'-TCCACTTCGAAAATGAA-3' (ヌクレオチド-73-57に相補的) をプライマーとして 8 日齢のチキンリバー-poly(A)⁺RNA を鋳型とし、プライマー伸長反応により cDNA を合成した。得られたクローン 3×10⁶ 個の形質転換体を、ヌクレオチド-154-78を含む cDNA フラグメントでスクリーニングしてクローン pACC 243 を得た。

③ cDNA の配列分析

色々な制限酵素断片又は BAL 31ヌクレアーゼにより連続して短く切断した断片をプラスミド pUC 18又は pUC19にサブクローニングした。ヌクレオチドの配列決定はジデオキシシチンターミネーター法 (文献 19、20) を用いて二本鎖プラスミド DNA から直接決定した。又は、色々な制限酵素断片の 5' 末端を T4ポリヌクレオキナーゼと [γ-³²P] ATP を用いて標識し、マキサム・ギルバート法により決定した。この結果を第 1 図に示す。

④ ペプチド分離とアミノ酸配列決定

-15-

表 1

チキンリバーアセチル-CoAカルボキシラーゼをアクロモバクタープロティナーゼ I 又はスタフィロコッカールセリンプロティナーゼによって消化して得られたペプチドの配列分析。

Peptide 4-3			Peptide 4-5		
Cycle	Residue (Yield)	Position No.	Cycle	Residue (Yield)	Position No.
1	Phe (1360)	2040	1	Glu (1340)	1413
2	Gly (720)	2041	2	Ala (1210)	1414
3	Ala (720)	2042	3	-	1415
4	Tyr (691)	2043	4	-	1416
5	Ile (444)	2044	5	Glu (583)	1417
6	Val (507)	2045	6	Tyr (703)	1418
7	Asp (376)	2046	7	Leu (644)	1419
8	Gly (319)	2047	8	Gln (489)	1420
9	Leu (349)	2048	9	Asn (400)	1421
10	Arg (153)	2049	10	Glu (268)	1422
11	Glu (223)	2050	11	Gly (244)	1423
12	Tyr (208)	2051	12	Glu (60)	1424
13	Arg (132)	2052	13	Arg (69)	1425
14	Gln (172)	2053	14	Leu (220)	1426
15	Pro (151)	2054	15	Leu (127)	1427
16	Val (124)	2055	16	Leu (48)	1428
17	Leu (81)	2056	17	Glu (79)	1429
18	Ile (86)	2057	18	Ala (74)	1430
19	Tyr (36)	2058	19	Met (64)	1431
Peptide 4-4			20	Asp (38)	1432
Cycle	Residue (Yield)	Position No.	21	Glu (16)	1433
1	Phe (537)	1341	22	Leu (60)	1434
2	Glu (300)	1342	23	Glu (33)	1435
3	Glu (324)	1343	24	Val (31)	1436
4	Asp (136)	1344	Peptide 4-8		
5	Arg (91)	1345	Cycle	Residue (Yield)	Position No.
6	Ile (159)	1346	1	Thr (427)	888
7	Tyr (132)	1347	2	Leu (520)	889
8	Arg (45)	1348	3	Arg (163)	890
9	His (43)	1349	4	Asp (247)	891
10	Leu (146)	1350	5	Pro (381)	892
11	Glu (112)	1351	6	Ser (64)	893
12	Pro (122)	1352	7	Leu (223)	894
13	Ala (110)	1353	8	Pro (64)	895
14	Leu (105)	1354	9	Leu (33)	896
15	Ala (64)	1355	10	Leu (98)	897
16	Phe (100)	1356	11	Glu (31)	898
17	Gln (40)	1357	12	-	899
18	Leu (31)	1358	13	Gln (31)	900
19	Glu (21)	1359	14	Asp (24)	901
20	Leu (16)	1360	15	Ile (24)	902
21	Asn (9)	1361	16	Met (14)	903

-17-

アセチル-CoAカルボキシラーゼをチキンリバーから精製した (文献 7)。該酵素をスタフィロコッカールセリンプロティナーゼ (Staphylococcal serine proteinase) 又はアクロモバクタープロティナーゼ I (Achromobacter proteinase I) で消化し、ついで各ペプチド断片に分離した。ペプチドの断片とネイティブ (native) なアセチル-CoAカルボキシラーゼのアミノ末端配列はガスフェイズシーケンサー (Gas-phase Sequencer) と PTB-アミノ酸分析器 (バイオシステム社製、モデル 470A 及び 120A) を用いて分析した。その結果を表 1 に示す。

-16-

Peptide 4-10			Peptide 4-20		
Cycle	Residue (Yield)	Position No.	Cycle	Residue (Yield)	Position No.
1	Val (190)	2209	1	Val (345)	94
2	His (172)	2210	2	Asp (140)	95
3	Asp (112)	2211	3	Val (127)	96
4	Ala (280)	2212	4	Gln (86)	97
5	Asn (189)	2213	5	Arg (40)	98
6	Pro (268)	2214	6	Asp (40)	99
7	Glu (144)	2215	7	Phe (93)	100
8	Leu (276)	2216	8	Thr (26)	101
9	Thr (72)	2217	9	Val (69)	102
10	Asp (48)	2218	10	Ala (40)	103
11	Gly (86)	2219	11	Ser (9)	104
12	Gln (93)	2220	12	Pro (40)	105
13	Ile (98)	2221	13	Ala (33)	106
14	-	2222	14	Glu (26)	107
15	Ala (64)	2223	15	Phe (30)	108
16	Met (72)	2224	16	Val (30)	109
17	Leu (55)	2225	17	Thr (7)	110
18	Arg (16)	2226	18	Arg (31)	111
19	Arg (14)	2227	19	Phe (20)	112
Peptide 4-15			20	Gly (21)	113
Cycle	Residue (Yield)	Position No.	Peptide 41-46 ^d		
1	Val (417)	324	Cycle	Residue (Yield)	Position No.
2	Asn (228)	325	1	His (79)	1596
3	Asn (192)	326	2	Ala (72)	1597
4	Ala (112)	327	3	Phe (158)	1598
5	Asp (100)	328	4	Leu (141)	1599
6	Asp (57)	329	5	Pro (169)	1600
7	Phe (122)	330	6	Thr (36)	1601
8	Pro (168)	331	7	Pro (50)	1602
9	Asn (98)	332	8	Pro (163)	1603
10	Leu (105)	333	9	Leu (110)	1604
11	Phe (62)	334	10	Pro (84)	1605
12	Arg (38)	335	11	Ser (26)	1606
13	Gln (69)	336	12	Asp (69)	1607
14	Val (52)	337	Peptide 4-19		
Peptide 4-19			Cycle	Residue (Yield)	Position No.
Cycle	Residue (Yield)	Position No.	1	Asp (1513)	1894
1	Asp (1513)	1894	2	Pro (1500)	1895
2	Pro (1500)	1895	3	Ile (1290)	1896
3	Ile (1290)	1896	4	Asp (744)	1897
4	Asp (744)	1897	5	Arg (429)	1898
5	Arg (429)	1898	6	Thr (254)	1899
6	Thr (254)	1899	7	Ile (357)	1900
7	Ile (357)	1900	8	Asp (232)	1901
8	Asp (232)	1901	9	Phe (192)	1902
9	Phe (192)	1902	10	Val (177)	1903
10	Val (177)	1903	11	Pro (115)	1904
11	Pro (115)	1904	12	Thr (126)	1905
12	Thr (126)	1905	13	Lys (21)	1906
13	Lys (21)	1906			

a. PTB-アミノ酸の生成量は () 内に pmol で示す。

b. アセチル-CoAカルボキシラーゼの推定一次構造における各アミノ酸残基の位置番号を示す。

-18-

以上に記したように、チキンリバー由来のアセチル-CoAカルボキシラーゼのmRNAに相補的なcDNAをクローニングしてその配列分析をした結果から推定された全アミノ酸配列は該酵素の部分的なアミノ酸配列分析とよく一致した。

(以下余白)

引用文献

1. Numa, S., and Tanabe, T. (1984) in *Fatty Acid Metabolism and Its Regulation* (Numa, S., ed.) New Comprehensive Biochemistry, vol. 7 pp. 1-27, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam
2. Wakil, S. J., Stoops, J. K., and Joshi, V. C. (1983) *Annu. Rev. Biochem.* 52, 537-579
3. Song, C. S., and Kim, K. E. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 7786-7788
4. Tanabe, T., Wada, K., Okazaki, T., and Numa, S. (1975) *Eur. J. Biochem.* 57, 15-24
5. Tippers, J. P., and Vitters, L. A. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 715, 162-169
6. Beaty, M. B., and Lane, M. D. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 924-929
7. Wada, K., and Tanabe, T. (1983) *Eur. J. Biochem.* 135, 17-23
8. Manning, R., Dils, R., and Mayer, R. J. (1976) *Biochem. J.* 153, 463-468

-19-

-20-

9. Hardie, D. G., and Cohen, P. (1978) *Eur. J. Biochem.* 92, 25-34
10. Rainwater, D. L., and Kolattukudy, P. E. (1982) *Arch. Biochem. Biophys.* 213, 372-383
11. Takai, T., Wada, K., and Tanabe, T. (1987) *FEBS Lett.*, 212, 98-109
12. Okayama, H., and Berg, P. (1982) *Mol. Cell. Biol.* 2, 161-170
13. Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, pp. 230-241, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
14. Noda, M., Furutani, Y., Takahashi, H., Toyosato, M., Hirose, T., Inayama, S., Nakanishi, S., and Numa, S. (1982) *Nature*, 295, 202-206
15. Takai, T., Noda, M., Furutani, Y., Takahashi, H., Notake, M., Shimizu, S., Kayano, T., Tanabe, T., Hirose, T., Inayama, S., and Numa, S. (1984) *Eur. J. Biochem.* 143,

109-115

16. Maxam, A. M., and Gilbert, W. (1980) *Methods Enzymol.* 65, 499-560
17. Weinstein, R., Sweet, R., Weiss, M., Cedar, H., and Axel, R. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 1299-1303
18. Feinberg, A. P., and Vogelstein, B. (1983) *Anal. Biochem.* 132, 6-13
19. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 5463-5467
20. Furutani, Y., Notake, M., Fukui, T., Ohue, M., Nomura, H., Yamada, M., and Nakamura, S. (1986) *Nucleic Acids Res.* 14, 3167-3179
21. Kozak, M. (1981) *Nucleic Acids Res.* 9, 5233-5252

(以下余白)

-21-

-22-

4. 図面の簡単な説明

第1図はチキンリバー由来のアセチル-CoAカルボキシラーゼに対するcDNAの配列決定戦略と制限酵素地図。

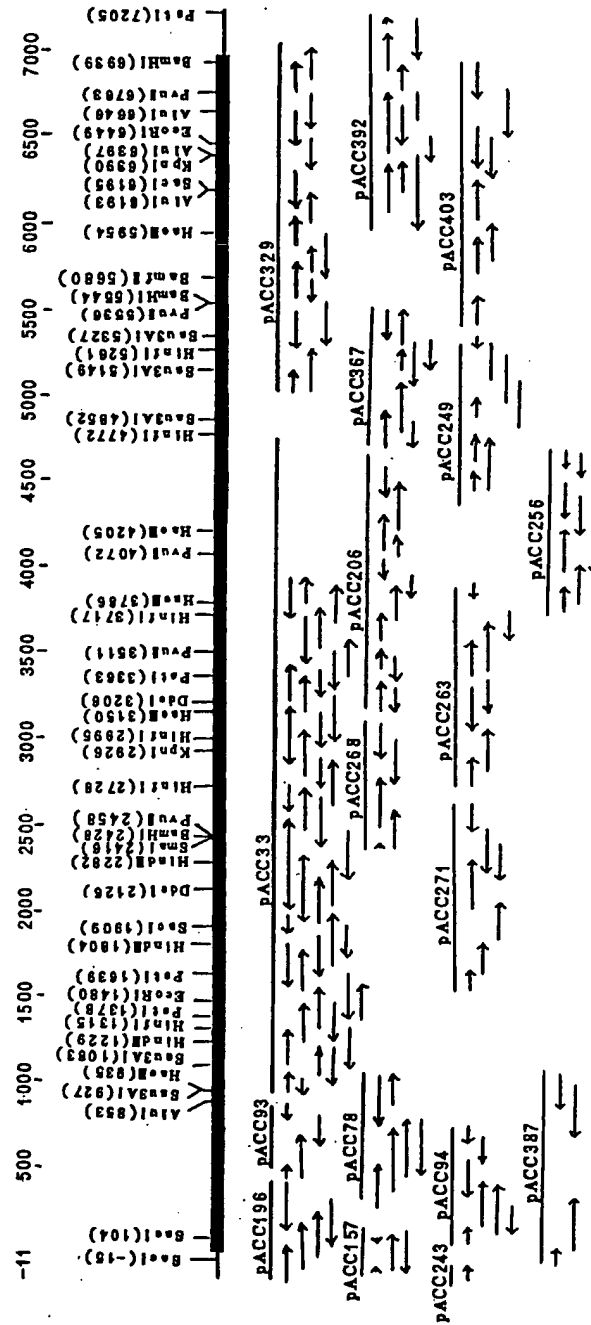
第2図はチキンリバーアセチル-CoAカルボキシラーゼのクローン化したcDNAのヌクレオチド配列と該酵素蛋白の推定アミノ酸配列である。

出 願 人 明 治 乳 業 株 式 会 社

-23-

図面の浄書

第 1 図



第2図(その1)

5' ----- CATC

GCCGCGCCCCAGCACC GCCGCTGCCCTGACCAGGCCGGGGGCCCGCGCGCTCCACC GCGCCCGGACCCCTGACTTCATTTTGGAAAGTGGATA
 ACTGCTCAGATTGCAAGAATAACAAGAGTGCTGAGAGCTCAATTTGGGGGAGCCATGGAAGAGTCTTCCCAACCTGCTAAACCCCTGGAGATGAAC
 M B B S S Q P A K P L B M N
 CCTCACTCTCGCTTTATTATTGGTTCCGTGTCAGAGGATAACTCAGAAGATGAGACGAGCTCCTTGGTGAACCTGACCTGCTGGAGGAGAAAGAG
 P H S R P I I G S V S B D N S B D B T S S L V K L D L L B B K B
 AAGTCTCTGCTCCCTGTTTCTGCTGCTCGGATTCCTTTTGGGACTTCTAGTCTCAAGATGGTTTGGCAAAACCATATGAGGCCACG
 R S L S P V S V C S D S L S D L G L P S A Q D G L A N H M R P S
 ATGCTGCTGTTGCACTCGTAAAGCAAGGCCGGGACAGGAAGAAAGTTGACGTGCGAGCGGATTTCACTGTGGCTTCTCCAGCAGAATTTGTTACT
 M S G L H L V K Q G R D R K K V D V Q R D P T V A S P A B P V T
 CGTTTGGAGGGAACAGAGTTATTGAGAAGGTCTGATAGCCAACATGGGATTGCAGCAGTGAATGCATGAGGTCGATCCGGCGCTGGTCCTAT
 R P G G N R V I B K V L I A N N G I A A V K C M R S I R R W S Y
 GAGATGTTCCGAAACGAGCGGGCAATCAGATTTGTTGTCATGGTGACTCCTGAGGACCTGAAAGCAAATGCAAGTACATTAATGGCAGATCAC
 B M P R N B R A I R P V V M V T P B D L K A N A B Y I K M A D H
 TACGTGCCAGTTCAGGAGGACCAAAACAACAACATGCAAAATGTTGGAACCTCATTCTCGATATTGCAAAACGATTCAGTGCAGGCTGTTGG
 Y V P V P G G P N N N N Y A N V B L I L D I A K R I P V Q A V W
 GCTGGCTGGGGCCATGCCTCCGAGAACCCTAACTACCAAGACTTCTCCCAAAAATGGGATTGCTTTCATGGGCTCTCAAGCCAAGCAATGTGG
 A G W G H A S B N P K L P B L L H K N G I A F M G P P S Q A M W
 GCTTAGGAGATAAAATTGCGTCGTCATAGTGGCTCAGACTGCTGGCATCCCAACTCTTCTTGGAAATGGCAGTGGTCTTGAAGTGGATTGGCAG
 A L G D K I A S S I V A Q T A G I P T L P M N G S G L R V D W Q
 GAGAATGATCTTCAGAAGCGTATCCTGAATGTTCTCAGGAGCTGTATGAAAAAGGCTATGTGAAGATGACAGCAGTGGCTGCGGGCTGCTGAG
 B N D L Q K R I L N V P Q B L Y B K G Y V K D A D D G L R A A B
 GAAGTGGCTACCTGTGATGATCAAGGCTCTGAAGGAGGAGGAGGGAAGGAATAGGAAAGTCAATAATGCGGATGACTTCCCAACCTATTT
 B V G Y P V M I K A S B G G G G K G I R K V N N A D D P P N L P
 AGACAGGTTCAAGGCTCAAGTCCAGGCTCTCCGATCTTTGTAATGAGGCTAGCCAAACAGTCCGCACTTGGAGGTCGAGATCCTGGCAGACCA
 R Q V Q A B V P G S P I P V M R L A K Q S R H L B V Q I L A D Q
 TATGGCAATGCCATCTCTCTTGGTGGGATTGCTCCGTGCAACGCAAGGCTCAGAAGATTATTGAAGAGCACCTGCTTCTATTGCAACTCG
 Y G N A I S L P G R D C S V Q R R H Q K I I E B A P A S I A T S
 GTGGTATTGAGCAGATGGAACAGTGTGAGTGAAGCTTGAAGAAATGGTGGGGTATGTGAGTGGGGCACTGTGGAATACCTGTACAGCCAGGAT
 V V P B H M B Q C A V K L A K M V G Y V S A G T V B Y L Y S Q D
 GGCAGCTCTACTTTCTGGAATGAAATCCCGTCTGCAAGTGGAGCACCCTGCAAGGAGATGGTATGCTGATGTTAATCTTCTGCAAGCAGCTC
 G S P Y P I B L N P R L Q V B H P C T B M V A D V L P A A Q L
 CAGATTGCCATGGGATTCCACTCCACGATCAAGGATATCCGAGTGTATGTTGGTGTTCCTCATGGGAGATGGATCTATTGATTTGAGAAT
 Q I A M G I P L H R I K D I R V M Y G V S P W G D G S I D P B N
 TCAGCCCATGTCCTCTGTCACGTGGCCATGTTATTGCTGCACGTATCACCAGTCAAGTCTGATGAGGGAATTAAGCCAGTTCTGGTACAGTC
 S A H V P C P R G H V I A A R I T S B N P D B G P K P S S G T V
 CAGGAACTGAATTTCCGAGCAATAAGAATGTTTGGGGCTATTTCACTGTTGCTGCTGCAAGGAGGCTGATGAATTTGCTGATTTCACTGTTGGT
 Q B L N P R S N K N V M G Y P S V A A A G G L H B P A D S Q P G
 CACTGCTTCTTGGGAGAGAAATCGTGAAGAAGCCATCTCAACATGGTGGTGGCTTTGAAGGAGCTGTCATCCGAGGAGGATTTCCGAACCACT
 H C P S W G B N R B B A I S N M V V A L K B L S I R G D P R T T
 GTTGAATACTTGATAAAACTGTTGGAACAGAAAGCTTCCAGCAGAACCAGATTGACACTGGCTGGTGGATCGCTTATTGCTGAGAAAGTGCAG
 V B Y L I K L L B T B S P Q Q N R I D T G W L D R L I A B K V Q
 GCTGAAAGGCTGATACCATGCTAGGAGTGGTATGTGGAGCTCTTCACTGCTGATGTGAGCTTTGAAACAGCGCTCTCAAACTTCTGCACTCT
 A B R P D T M L G V V C G A L H V A D V S P R N S V S N P L H S
 TTGAAAGGAGGCAAGTCTGCTGCTATATTTGCTAAACACTGTGGATGTGGAACCTCATCTATGAAGGAGGAAATATGTGTTGAAGGAGGAGC
 L B R G Q V L P A H T L L N T V D V B L I Y P G R K Y V L K V T
 CAGAGTCTCCCAATTCCTACGTGGTCTCATGAAACAGCTCTTGTGTGGAAGTGTGATGTGACAGACTGAGCGATGGAGGGCTGCTCTATCTTAC
 R Q S P N S Y V V I M N S S C V B V D V H R L S D G G L L L S Y

第 2 図 (その 2)

GATGGTAGCAGCTACACCACCTACATGAAAGAAGAGTGGACAGGTATCGCATCACTATAGGTAACAAGACCTGTGTGTTGAAAAGGAAAATGAT
 D G S S Y T T Y M K B B V D R Y R I T I G N K T C V F B K E N D
 CCTTCTATTCTGCGCTCACCTTCGGCTGGGAAGCTTATCCAGTATGTGGTGGAGGATGGGGACAGCTGTTGCAAGCCAATGCTTTGCAAGAAAT
 P S I L R S P S A G K L I Q Y V V B D G G H V P A G Q C P A B I
 GAGGTGATGAAAATGGTGATGACACTAACAGCAGGAGAGTCAGGCTGCATCCATTATGTCAAACGCCCCGGGGCAGTGCTGGATCCAGGCTGTGTG
 B V M K M V M T L T A G B S G C I H Y V K R P G A V L D P G C V
 ATTGCAAACCTCCAGCTGGATGATCCAGCAGGCTTCAGCAGGCTGAACGCACACAGGCACTTGGCACAGATCCAGAGCAGCACTTCGAGGC
 I A K L O L D D P S R V Q Q A B L H T G T L P Q I Q S T A L R G
 GAAAACTCCATCGCATCTTCCATTATGTCTGGATAACCTGGTCAACGTGATGAATGGGTACTGCCTGCCAGAGCCCTACTTTAGCAGCAAGGTG
 B K L H R I P H Y V L D N L V N V M N G Y C L P B P Y P S S K V
 AAGGGCTGGGTGAGGACTAATGAAGACACTGAGAGATCCATCTTTGCCTCTGCTGGAACCTCAGGACATCATGACCACTGTTCTGACGCGATT
 K G M V B R L M K T L R D P S L P L L B L Q D I M T S V S G R I
 CCACCAATGTGGAGAAGTCCATCAAGAAGGAGATGGCCCAATATGCCAGCAACATCAGTCAGTCTTTGCCAGTTTCCAGCCAACAGATGGCC
 P P N V B K S I K K B M A Q Y A S N I T S V L C Q F P S Q Q I A
 AATATCTTGGATGACCATGACGCCACTTGAACCGCAATCAGAGCGTGAGGTCTTTTTCATGAACACTCAGAGTATTGTGACGCTGTACAGAGG
 N I L D S H A A T L N R K S B R E V P P M N T Q S I V Q L V Q R
 TACCGGAGTGATTTCGGGTCACATGAAAGAGTGGTTCATGGATTGTCTCGTCAATATCTGAAGGTGGAGACTCAGTTTCAGCATGGTCACTAT
 Y R S G I R G H M K A V V M D L L R Q Y L K V E T Q F O H G H Y
 GACAAGTGTCTTTTGCCTTCGGGAAGAGAATAAAGCGACATGAATGCTGATTGAACATACATCTTCTACATGCTCAGGTCACCAAGAAGAAC
 D K C V F A L R B B N K S D M N A V L N Y I F S H A Q V T K K N
 CTGCTTGTACAATGCTCATTGACAGCTCTGTGGCCGTGACCCACCTGACAGATGAGCTGATCAATATCTGACAGAGCTGACCCAGCTCAGC
 L L V T M L I D Q L C G R D P T L T D B L I N I L T B L T Q L S
 AAGACAACCAACGCAAGTGGCGCTGCGGGCAGGCGGCTTCATTGCTTCCCATTTGCCGTCTACGAGCTGCTCACAACCAAGGTGGAGTCC
 K T T N A K V A L R A R Q V L I A S H L P S Y B L R H N Q V B S
 ATCTTCTATCTGCTATGACATGTATGGACACAGTTCGCTGAGAACCTGACAGAACTCATTTTGTGACAGACATCCATCTTGTATGTGCTA
 I F L S A I D M Y G H Q P C I B N L Q K L I L S B T S I F D V L
 CCCAATTTTTCTACCACAGTAATCAGGTGGTGAAGATGGCAGCTTGGAGGTGACGTTGCAAGGGCGTACATTGCCACGAGCTGAACAGCGTC
 P N P F Y H S N Q V V R M A A L B V Y V R R A Y I A Y B L N S V
 CAGCACCGCAGCTGAAGGACAACACCTGCGTGGTGGAGTTCAGTTCATGCTGCCACCTCCACCCAAACAGAATGCTCTTCTTCCAACTTC
 Q H R Q L K D N T C V V B P Q P M L P T S H P N R M S F S S N L
 AATCACTACGGGATGGTCCAGTACGAGTGTGAGTGACGCTGCTGGAACACTCGTTCACTCCCCGTGCCAGCGGATGGAGGGATGGTCTCT
 N H Y G M V H V A S V S D V L L D N S P T P P C Q R M G G M V S
 TTCCGACAGTTTGAAGATTTTGTGAGAATCTTGTGAGAGTGTGAGTGTGTTTTTGGACTCTCTCCCAAGAGCCCAACCTTCCCTGAAGCTGGC
 P R T F B D P V R I F D B V M S C F C D S P P Q S P T P P B A G
 CATGCTTCCCTCTATGATGAAGACAAGGCTGCCGTGAGGAGCCCATTEACATTCTTAATGTGCTATTAAGTGAATGGGAGCTGGATGATGAT
 H A S L Y D B D K A A R B B P I H I L N V A I K T D G D V D D D
 GGGCTGGCAGCATGTTGAGAGAGTTCACACAAAGCAAGAAATCAGTCTGATTGAGCATGGCATCCGGAGGCTGACATTCTTGTGGACAGAAAG
 G L A A M F R B P T Q S K K S V L I B H G I R R L T P L V A Q K
 AGGGAATTTCCAAAGTCTTTCAGCTTCCGTGCCAGGATAAGTTTGAAGAAGACAGAATCTACCGCATCTGGAGCCAGCTTGGCTTTCAGCTG
 R B P P K F F T P R A R D K P B B D R I Y R H L B P A L A P Q L
 GAGCTGAACCGAATGCGGAACCTTGACCTCACTGCAATCCATGTGCCAACCAATAAATGCACTCTACCTGGGAGCAGCTAAAGTTGAAGTAGGA
 B L N R M R N F O L T A I P C A N H K M H L Y L G A A K V B V G
 ACAGAAGTGACAGACTACAGGTTCTTGTGAGGGCATTATAAGGCATTGACACCTTGTACCAAGGAAGCTCTTTCAGTACCTGCAAAACGAG
 T B V T D Y R P P V R A I I R H S D L V T K B A S P B Y L Q N B
 GGAGAGCGATTGCTTTTGAAGCCATGGATGAGTGGAGGTGGCATTAATAATACCAACGTGGCAGCGGACTGCAATACATCTTCTTAATTTT
 G B R L L L B A M D B L B V A P N N T N V R T D C N H I P L N P
 GTGCTACTGTATCATGAGCCATCCAAGATCGAGGAATCCGTGGGAGCATGGTGTGCTACGGAGCCGCTGTGGAGCTCCGCGTCTC
 V P T V I M D P S K I B B S V R S M V M R Y G S R L M K L R V L
 CAGGCGGAGCTGAAGATCAACATTGCGCTGACACCGAGAGAAAGGCCATCCCATTCGTCTCTTCTGACCAACGAGTGGGCTACTACCTGGAG
 Q A B L K I N I R L T P T G K A I P I R L P L T N B S G Y Y L D

第2図(その3)

ATCAGCCTGTACAAAGAGGTGACGGATTCCAGGACAGGGCAGATTATGTTCCAGGCCTATGGGGATAAACAGGGACCCTTCACGGGATGCTGATA
 I S L Y K B V T D S R T G Q I M F Q A Y G D K Q G P L H G M L I
 AATACCCCATACGTGACCAAGGACCTTCTCAGTCCAAGAGATTCCAGGCACAGTCTTTAGGGACATCTATGTCTATGACATTCTCGAGATGTTT
 N T P Y V T K D L L Q S K R P Q A Q S L G T S Y V Y D I P B M P
 CGGCAGTCTTTAATTAACCTCTGGGATTCTATGAATGAACATGCATTCTGCAACACCGCGCTGCCGTCTGACATACTGACATACACTGAATTG
 R Q S L I K L W D S M N B H A P L P T P P L P S D I L T Y T B L
 GTGCTGGATGATCAGGGCCAGCTCGTGACATGAACAGGCTGCCAGGAGGAAACGAGATTGGGATGGTAGCCTGGAAAATGACCTCAAGACCCCG
 V L D D Q G Q L V H M N R L P G G N B I G M V A W K M T L K T P
 GAGTATCCCAAGGCCGTGATATCATCGTCATTGGCAATGACATTACGTACCGGATAGGTTCTTTGGGCCTCAGGAGGACGTGCTGTTCTCGAGG
 B Y P B G R D I I V I G N D I T Y R I G S P G P Q P D V L P L R
 GCTTCAGAGCTTGCTCGAATCATGGCATCCCCGCATCTACGTGGCTGCCAACAGCGGAGCCAGGATTGGTTGGCTGAGGAGATCCGGCAGATG
 A S B L A R T H G I P R I Y V A A N S G A R I G L A B B I R H M
 TTCCATGTTGCGTGGGAAGATCCAGATGACCCATACAAAGGATACAAGTACTTGTATCTGACACCTCAAGACTATAAGAAAGTCAGCGCTCTGAAC
 F H V A W B D P D D P Y K G Y K Y L Y L T P Q D Y K K V S A L N
 TCAGTTCACTGTGAACACGTGGAGGACAACGGAGAGTCCAGGTATAAGATAACAGATATTATCGGAAAGGAAGACGGACTTGGAAATAGAGAACCTC
 S V H C B H V B D N G B S R Y K I T D I I G K B D G L G I B N L
 AGAGGATCTGGCATGATTGCTGGAGAATCATCTTTAGCCTACGAGAGTATTATCACCATCAACTTGGTTACGTGTGGGCAATTGGAATTTGGAGCT
 R G S G M I A G B S S L A Y B S I I T I N L V T C R A I G I G A
 TACCTCGTTGCGTTAGGGCAGAGGACTATCCAGGTTGAGAATCTCACAATACTGACTGGCTGTGGAGCCCTCAACAAGGTGCTGGGACGGGAG
 Y L V R L G D R T I Q V B N S H I I L T G C G A L N K V L G R B
 GTGTACACCTCCAACAACCGCTGGGCGGGATCCAGATCATGCAACAACGGGGTGACCCACGGCACCCTGTGCGAGCAGTTTGAAGGAGTCTAC
 V Y T S N N Q L G G I Q I M H N N G V T H G T V C D D P B G V Y
 ACTATCTGCTGTGGCTTTCTACATGCCCAAGAGCGTATACAGCCCTGTTCTCTATCTCAAGGTCAAGGATCTATAGACAGAACCATAGACTTC
 T I L L W L S Y M P K S V Y S P V P I L K V K D P I D R T I D P
 GTTCTACCAAGACTCCCTATGATCTCGCTGGATGCTGGCTGGACGCCAAATCCAAGTCAAAAAGGGCAATGGCAGAGCGGTTCTTTGACAAT
 V P T K T P Y D P R W M L A G R P N P S Q K G Q W Q S G P F D N
 GGCTCGTTCTGGAGATCATGACGCCCTGGGCACAGAGCGTTGTTGGTGGCAGAGCAAGGCTGGGAGGAATACCTGTAGGAGTAGTGGCTAGAA
 G S F L B I M Q P W A Q T V V V G R A R L G G I P V G V V A V B
 ACCAGAACAGTGGAGCTGAGCATCCCTGCTGATCCCGCAACCTGGACTCGGAGGCCAAGATAATCCAGCAGGCTGGTCAAGGTGGTCCCGGAC
 T R T V B L S I P A D P A N L D S B A K I I Q Q A G Q V W P P D
 TCTGCCTTAAGACAGCCAGGCCATCAAGCACTTCAACAGAGAAGGGCTGCCTCTGATGGTCTTTGCCAACTGGAGAGGCTTCTGTTGGGCGATG
 S A P K T A Q A I N D P N R B G L P L M V P A N W R G P S G G M
 AAAGACATGACGACCAAGTCTCAAGTTGGTGGCTACATCGTGGACGGCTGCGGGAGTACCGGCAGCCGCTGCTCATCTACATCCCAACCGCAG
 K D M Y D Q V L K P G A Y I V D G L R B Y R Q P V L I Y I P P Q
 GCGGAGCTCAAGGGCGGCTCTGGGCTGTATCGACCCACCATCAACCCAGGCACATGGAGATGTACGGGACCTGAAAGCAGAGGGGGAATC
 A B L R G G S W A V I D P T I N P R H M B M Y A D R B S R G G I
 CTGGAGCCGGAGGGGACGGTGGAAATCAAGTTCCGAGGAAGGACCTGGTGAAGACAATGAGGAGAGTGGACCCGCTCTACATGCGGCTGGCGGAG
 L B P B G T V B I K P R R K D L V K T M R R V D P V Y M R L A B
 CGGCTGGGTACCCCTGAGCTGAGTGTGCCGACCGAAAAGACCTGGAGAGCAAACTGAAGGAGCGGGAGGAATTCCTGATTCCCATTTACCACAG
 R L G T P B L S A A D R K D L B S K L K B R B B P L I P I Y H Q
 GTGGCCATGACGTTTGTGCTGACCTGCACGACACACCGGCCCATGACGAGGAAGGGTCCATCACGGACATTCTGGACTGGAAAACGCTTCGGACC
 V A M Q P A D L H D T P G R M Q B K G A I T D I L D W K T S R T
 TTCTTCTACTGGAGGCTGAGACGTCTTCTTCTGGAAGATGGGTCAAAAAGAGATCCATGATGCCAACCTGAGCTGACCGACGGGACAGATCCAG
 P F Y W R L R R L L L B D V V K K K I H D A N P B L T D G Q I Q
 GGCATGCTGCGACGCTGGTTTGTGGAAGTGGAGGGGACGGTAAAGGCGTACCTGTGGGACAGCAATAAGGACCTGGTGGAGTGGCTGGAGAAGCAG
 A M L R R W P V B V B G T V K A Y L W D S N K D L V B M L B K Q
 CTGATGGAGGAGGAGGGGTTGCTCGGTTGTGGATGAGAACATTAAGTACATCTCCAGGGATTACATCTGAAGCAGATCCGACGCTGGTCCAG
 L M B B B G V R S V V D B N I K Y I S R D Y I L K Q I R S L V Q
 GCGAATCCCGAGGTTGCCATGGATTGATCGTGCATGACCCAGCATATACCCACCCAGCGAGCCGAGATCGTGGGATCCTCTCCACAATG
 A N P B V A M D S I V H M T Q H I S P T Q R A B I V R I L S T M

第2図(その4)

GACTCTCCTTCTTCAACGTAAGAGCATCGATTCCTGTACTCCCCCTGCTCGGTACAGTGGAGGGGAAGAAAAAGAAAAAGCTCAGAATTG
D S P S S T
CCCTTTGTCTGCTCAACTGCGACCGCTGTACCGAGACGGGGAAGGCTCAGGGAACGCTGGAAGAGTGACAGTTTTAGTTTTTCAAACCAAGACTGA
CCAGAGGAAGTCGCTTTGGCCGGAGACAGGGAAGATGTATAAACACGGGCCCTGCAAGGATTGAGTT ----- 3'

手続補正書(方式)

昭和63年12月27日

特許庁長官 吉田文毅 殿

1. 事件の表示

昭和63年特許願第208170号

2. 発明の名称

アセチル-CoA カルボキシラーゼ

3. 補正をする者

事件との関係 出願人

住所 東京都中央区京橋2-3-6
名称 明治乳業株式会社(613)
代表取締役 島村靖三

4. 補正命令の日付

昭和63年11月29日(発送)

5. 補正の対象

明細書の「発明の詳細な説明」の欄及び「図面の簡単な説明」の欄及び図面

6. 補正の内容

(1) 明細書第17及び18頁を次の如く訂正する。

「 表1

チキンリバーアセチル-CoAカルボキシラーゼ
をアクロモバクタープロティナーゼI又はスタ
フィロコッカルセリンプロティナーゼによって
消化して得られたペプチドの配列分析。

	サイクル	残基	生成量 ^{a)}	位置番号 ^{b)}
ベ ブ チ ド 4-3	1	Phe	(1360)	2040
	2	Gly	(720)	2041
	3	Ala	(710)	2042
	4	Tyr	(691)	2043
	5	Ile	(444)	2044
	6	Val	(607)	2045
	7	Asp	(376)	2046
	8	Gly	(319)	2047
	9	Leu	(348)	2048
	10	Arg	(153)	2049
	11	Glu	(223)	2050
	12	Tyr	(208)	2051
	13	Arg	(112)	2052
	14	Gln	(172)	2053
	15	Pro	(151)	2054
	16	Val	(124)	2055
	17	Leu	(81)	2056
	18	Ile	(86)	2057
	19	Tyr	(36)	2058
ベ ブ チ ド 4-4	1	Phe	(537)	1341
	2	Glu	(300)	1342
	3	Glu	(324)	1343
	4	Asp	(136)	1344
	5	Arg	(91)	1345
	6	Ile	(158)	1346
	7	Tyr	(132)	1347
	8	Arg	(45)	1348
	9	His	(43)	1349
	10	Leu	(146)	1350
	11	Glu	(112)	1351
	12	Pro	(122)	1352
	13	Ala	(110)	1353
	14	Leu	(105)	1354
	15	Ala	(64)	1355
	16	Phe	(100)	1356
	17	Gln	(40)	1357
	18	Leu	(31)	1358
	19	Glu	(21)	1359
	20	Leu	(16)	1360

- 3 -

	21	Asn	(9)	1361
ベ ブ チ ド 4-5	1	Glu	(1340)	1413
	2	Ala	(1210)	1414
	3	-		1415
	4	-		1416
	5	Glu	(583)	1417
	6	Tyr	(703)	1418
	7	Leu	(844)	1419
	8	Gln	(489)	1420
	9	Asn	(400)	1421
	10	Glu	(268)	1422
	11	Gly	(244)	1423
	12	Glu	(60)	1424
	13	Arg	(69)	1425
	14	Leu	(220)	1426
	15	Leu	(127)	1427
	16	Leu	(48)	1428
	17	Glu	(79)	1429
	18	Ala	(74)	1430
	19	Met	(64)	1431
	20	Asp	(38)	1432
	21	Glu	(16)	1433
	22	Leu	(60)	1434
	23	Glu	(33)	1435
	24	Val	(31)	1436
ベ ブ チ ド 4-8	1	Thr	(427)	888
	2	Leu	(528)	889
	3	Arg	(163)	890
	4	Asp	(247)	891
	5	Pro	(381)	892
	6	Ser	(64)	893
	7	Leu	(223)	894
	8	Pro	(64)	895
	9	Leu	(33)	896
	10	Leu	(98)	897
	11	Glu	(31)	898
	12	-		899
	13	Gln	(31)	900
	14	Asp	(24)	901
	15	Ile	(24)	902
	16	Met	(14)	903
	1	Ile	(148)	2209
	2	His	(172)	2210

- 4 -

ベ ブ チ ド 4-10	3	Asp	(112)	2211
	4	Ala	(280)	2212
	5	Asn	(189)	2213
	6	Pro	(288)	2214
	7	Glu	(144)	2215
	8	Leu	(276)	2216
	9	Thr	(72)	2217
	10	Asp	(48)	2218
	11	Gly	(86)	2219
	12	Gln	(93)	2220
	13	Ile	(98)	2221
	14	-		2222
	15	Ala	(64)	2223
	16	Met	(72)	2224
	17	Leu	(55)	2225
	18	Arg	(16)	2226
	19	Arg	(14)	2227
ベ ブ チ ド 4-15	1	Val	(417)	324
	2	Asn	(228)	325
	3	Asn	(192)	326
	4	Ala	(112)	327
	5	Asp	(100)	328
	6	Asp	(57)	329
	7	Phe	(122)	330
	8	Pro	(168)	331
	9	Asn	(98)	332
	10	Leu	(105)	333
	11	Phe	(62)	334
	12	Arg	(38)	335
	13	Gln	(69)	336
	14	Val	(52)	337
ベ ブ チ ド 4-19	1	Asp	(1510)	1894
	2	Pro	(1500)	1895
	3	Ile	(1290)	1896
	4	Asp	(744)	1897
	5	Arg	(429)	1898
	6	Thr	(254)	1899
	7	Ile	(357)	1900
	8	Asp	(232)	1901
	9	Phe	(192)	1902
	10	Val	(177)	1903
	11	Pro	(115)	1904
	12	Thr	(26)	1905
	13	Lys	(21)	1906

- 5 -

ベ ブ チ ド 4-20	1	Val	(345)	94
	2	Asp	(48)	95
	3	Val	(127)	96
	4	Gln	(86)	97
	5	Arg	(40)	98
	6	Asp	(48)	99
	7	Phe	(93)	100
	8	Thr	(26)	101
	9	Val	(69)	102
	10	Ala	(48)	103
	11	Ser	(9)	104
	12	Pro	(48)	105
	13	Ala	(33)	106
	14	Glu	(28)	107
	15	Phe	(38)	108
	16	Val	(38)	109
	17	Thr	(7)	110
	18	Arg	(21)	111
	19	Phe	(28)	112
	20	Gly	(21)	113
ベ ブ チ ド 4-1 KDa	1	His	(79)	1596
	2	Ala	(72)	1597
	3	Phe	(158)	1598
	4	Leu	(141)	1599
	5	Pro	(168)	1600
	6	Thr	(36)	1601
	7	Pro	(50)	1602
	8	Pro	(163)	1603
	9	Leu	(110)	1604
	10	Pro	(84)	1605
	11	Ser	(26)	1606
	12	Asp	(69)	1607

a) PTH-アミノ酸の生成量は () 内にpmolで示す。

b) アセチル-CoA カルボキシラーゼの推定一次構造における各アミノ酸残基の位置番号を示す。

(2) 明細書第23頁を次の如く訂正する。

「4. 図面の簡単な説明

第1図はチキンリバーアセチル-CoAカルボキシラーゼに対する配列決定戦略と制限酵素地図である。

制限酵素地図は代表的な制限酵素部位か、又は配列分析の際の末端標識に用いられた制限酵素部位のみを示している。それらは()内に示されたヌクレオチド番号により関連付けられている。poly(dA)・poly(dT)部分及びpoly(dG)・poly(dC)テール部分は制限酵素地図には含まれていない。蛋白質をコードする領域はクローズドボックス(closed box)で示され、特異的なプライマー(逆転写による伸長反応に用いられる)に用いられる配列はオープンボックス(open box)で示されている。

配列決定の方向と範囲は、用いられた各クローンの下側に水平の矢印で示してある。各矢印の末端における短い垂直の線は、マキサム・ギ

ルバート法に用いる化学修飾のための5'末端標識部位を示す(文献16)。破線はpACC 78における欠失した部分を示すか、又はpACC 33及びpACC 20Sのイントロン配列部分の長さを示す。

第2図はチキンリバーアセチル-CoAカルボキシラーゼに対するクローン化したcDNAのヌクレオチド配列と、該酵素蛋白の推定アミノ酸配列である。

ヌクレオチド残基は5'から3'方向へ番号が振られ、それは先導メチオンをコードするATCコドンの最初のヌクレオチド残基から始まる。残基1から5'側のヌクレオチド残基はマイナスを付した番号で示されている。

推定アミノ酸配列はヌクレオチド配列の下側に1文字表記で示されている。アミノ酸は先導メチオンから始まる番号が付されている。各行の右端にはヌクレオチド残基及びアミノ酸残基の番号が記載されている。アンダーラインは自動エドマン分解により決定されたアミノ酸残基を示しており、これらアミノ酸残基は以前報

-7-

-8-

告されたアミノ酸残基を含んでいる。ペプチド分解については表1を参照。点線で示したアンダーラインは配列分析したペプチドの中で確実な同定が出来なかった残基を示す。ビオチン結合部位はアスタリスクで印をつけてある。

出 願 人 明 治 乳 業 株 式 会 社

(3) 図面を別紙の通り訂正する。

-9-

ACETYL-CoA CARBOXYLASE

Patent Number: JP2057179
Publication date: 1990-02-26
Inventor(s): TANABE TADASHI
Applicant(s): MEIJI MILK PROD CO LTD
Requested Patent: ☐ JP2057179
Application Number: JP19880208170 19880824
Priority Number(s):
IPC Classification: C12N9/00; C12N15/52
EC Classification:
Equivalents:

Abstract

PURPOSE: To obtain a novel acetyl-CoA carboxylase having a specific nucleoside sequence and amino acid sequence, derived from chicken liver.

CONSTITUTION: One cDNA clone against acetyl-CoA carboxylase is separated using poly(A)⁺RNA obtained from egg laying hen liver by OKAYAMA-Burg's method. Said clone pACC 33 codes only a restricted part of polypeptide sequence of said enzyme and so, obtaining of cDNA clone group extending to nucleoside sequence coding whole protein of said enzyme is tried by using said clone pACC 33 as a probe. A part of nucleoside sequence and amino acid sequence is shown in the figure.

Data supplied from the esp@cenet database - I2